

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



EP 99/5467

4

REC'D 26 NOV 1999	
WIPO	PCT

## Bescheinigung

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 1. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Aktenzeichen: 198 45 224.1



Jerofsky

11.23.10.99

## Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

K

DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in Pflanzen

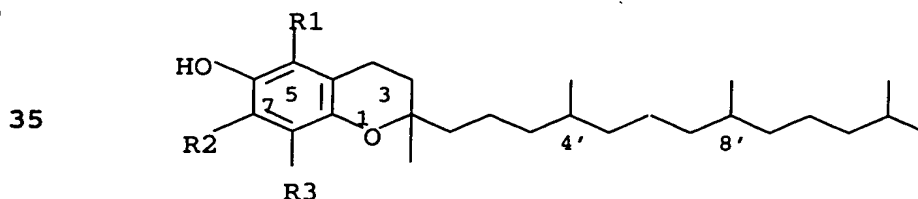
5

### Beschreibung

- Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung von DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

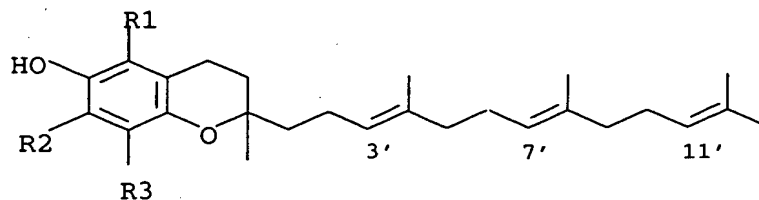
- Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a- d):



- 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

45

5



- 2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
10 2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

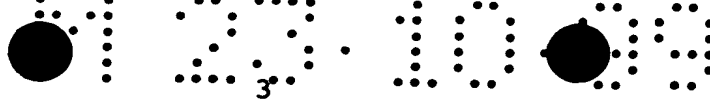
Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

- 15 Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert  
20 werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf  
25 Pflanzen der selben Art beschränkt.

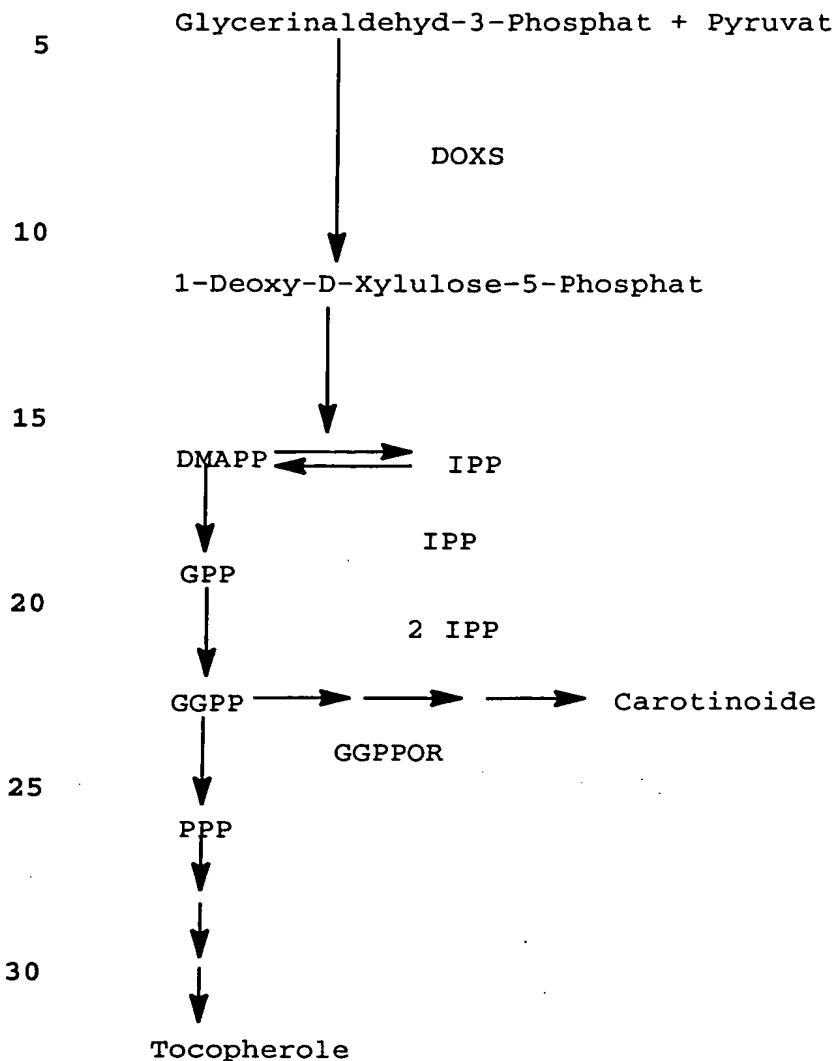
- Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthesegene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

- 35 Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus  $\text{C}_5$ -Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B.  
40 Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

- Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-CoA Einheiten, die über  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und  
45 Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit ( $\text{C}_5$ ), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in vivo Fütterungsexperimente mit  $\text{C}^{13}$  gezeigt, daß in verschiedenen



Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschrieben wird:



35 Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von  
 Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer  
 durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten  
 "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylu-  
 lose-5-Phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414  
 40 (1), 129-134 (1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94  
 (2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA  
 95(5), 2100-2104 (1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400  
 (3), 271-274 (1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare  
 Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische  
 45 Daten deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol ope-  
 riert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum  
 Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung,

1231099  
4

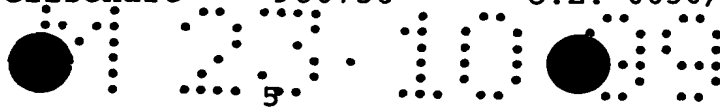
führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, *Physiol. Plant* 59 (1993), 50-60). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).

IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C<sub>10</sub>) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum Sesquiterpen (C<sub>15</sub>), Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C<sub>20</sub>) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C<sub>40</sub>-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere Bildung von Tocopherolen.

Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosylmethionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\gamma$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, *Biochemie der Pflanzen*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).

In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß directional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Carotinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, *Plant Mol. Biol.* 22(4), 589-602(1993); Fray et al., *Plant J.*, 8, 693-701 (1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., *Plant Physiol.* 112. 1617-1624 (1996)).





Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch  
5 verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvate-Dioxygenase (HPPD).

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.  
10

Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (GGPPOR)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.  
15

Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide  
20 erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Raps-pflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer heterologer Gene erreicht werden. DOXS-Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No.  
25 AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.

In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus E.coli (SEQ-ID No. 1; Rosa Putra et al., Tetrahedron Lett. 39(1998), 23-26; Acc. No.035440) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine  
30 Plastidenlokalisation zu gewährleisten wird der E.coli DOXS in einem weiteren Konstrukt eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

35 Um das nun vermehrt zur Verfügung stehende GGPP in Richtung Tocopherole und Carotinoide umzusetzen, wird in einem weiteren erfindungswesentlichen Schritt zusätzlich die Aktivität des Enzyms Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase durch Über-  
40 expression eines entsprechenden Gens gesteigert. Durch diese Maßnahme wird eine verstärkte Bildung von Phytylpyrophosphat durch verstärkte Umsetzung von Geranylgeranyl-Pyrophosphat zu Phytylpyrophosphat erreicht.

45 Hierzu wird beispielsweise das GGPPOR-Gen aus Arabidopsis thaliana (SEQ-ID No. 3) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten ist der

M 23 10 99

Arabidopsis GGPPOR eine Transitsignalsequenz vorangestellt. Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein GGPPOR-Gen codiert, das mit SEQ-ID No. 5 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.

5

In Ausführungsbeispiel 4 ist die Klonierung des GGPPOR-Gens aus Arabidopsis thaliana beschrieben.

Die Erhöhung der plastidären 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat und  
10 Phytylpyrophosphat Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide, so daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen, Chlorophyllen, Vitamin K und Phylloquinonen in den Plastiden zur Verfügung steht.

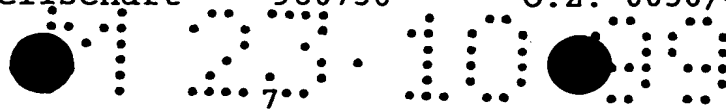
15 Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS- und das GGPPOR-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.

20

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3, die für eine DOXS bzw. GGPPOR oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/  
25 oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. GGPPOR kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.

30

Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende  
35 der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. GGPPOR-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die  
40 sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten  
45 Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zell-



kern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

5 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

10

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalin-Synthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

15

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

40

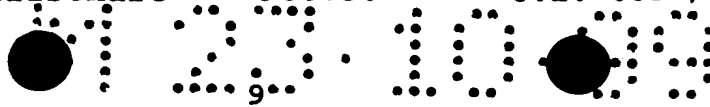
Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cyto-

45

11.23.10.99

solischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

- Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremd-
- 5 protein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-
- 10 Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.
- 15 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. GGPPOR-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. GGPPOR-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene
- 20 Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 30 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev.
- 35 Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).
- 40 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. GGPPOR-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translokation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. GGPPOR-Gens in die Chloroplasten vom DOXS-
- 45 bzw. GGPPOR-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist das Transitpeptid, das von der plastidären Trans-



ketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.

- 5 Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:

10 pTP09

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
15 TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGA  
TCC\_BamHI

pTP10

20 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGTGC  
GATCC\_BamHI

25

pTP11

KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTCCGGCCTTAA  
30 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAAGTGAAGTGCAGGGG  
ATCC\_BamHI

Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS bzw.

- 35 GGPPOR kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS bzw. GGPPOR-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons  
40 erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert  
45 werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßigerweise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente

miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker ange-  
setzt werden.

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regio-  
5 nen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker,  
der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion die-  
ser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker  
1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktions-  
stellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatori-  
10 schen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger  
als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ  
bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze  
sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkrip-  
tionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS-  
15 bzw. GGPPOR-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale  
Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander  
beliebig austauschbar.

Ferner können Manipulationen, die passende Restriktions-schnitt-  
20 stellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restrikti-  
onsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen,  
Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Trans-  
versionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerre-  
pair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten  
25 Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffül-  
len von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden  
der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das An-  
30 hängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schou-  
ten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die  
durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis  
vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natür-  
licherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen  
35 Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt wer-  
den.

Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadeny-  
lierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-  
40 Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, ins-  
besondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids  
pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)  
oder funktionelle Äquivalente.

45 Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven  
Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpep-  
tid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthal-

ten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für  
5 ein DOXS-Gen bzw. ein GGPPOR-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B.  
10 von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher  
15 Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette  
20 integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens bzw. eines GGPPOR-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS und GGPPOR kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Inser-  
25 tion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119  
30 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in  
35 E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

40 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des  
45 Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben. Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).

Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen bzw. GGPPOR-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen. Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den



Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere  
5 auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich  
isolierten für eine DOXS bzw. GGPPOR kodierende Sequenz, welche  
weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen  
Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder  
Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden  
10 beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorlie-  
gende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der  
DOXS- bzw. GGPPOR-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen  
Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthal-  
tenen kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer  
15 Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren  
Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, ab-  
geschwächt oder verstärkt ist.

20

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie,  
wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise  
der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Über-  
expression des DOXS- und des GGPPOR-Gens in Kulturpflanzen ver-  
25 mitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise  
durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter  
Proteine, die DOXS- bzw. GGPPOR-Aktivität aufweisen oder durch *in*  
*vitro*-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodie-  
rende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptid-  
30 sequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung  
erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit  
pflanzengenetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Compute-  
rauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden  
Pflanze leicht ermitteln.

35

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu  
nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei  
Bestandteil des Fusionsproteins ein DOXS- bzw. GGPPOR-Polypeptid  
oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil  
40 des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzyna-  
tischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit  
deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS- bzw. GGPPOR-Expression möglich  
ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei  
jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal-  
45 oder Transitpeptid, das das DOXS- bzw. GGPPOR-Protein an den  
gewünschten Wirkort leitet.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS- und des GGPPOR-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS- und des GGPPOR-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des DOXS- und des GGPPOR-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS- und GGPPOR-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS und des GGPPOR-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegen-  
5 stand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 und einer für die GGPPOR kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz  
10 gegenüber Inhibitoren der DOXS und der GGPPOR erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

15

- Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzen-  
20 zelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von  
25 Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS und GGPPOR durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.
- Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von  
30 Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer GGPPOR DNA-Sequenz in Pflanzen.  
35

Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### 40 Allgemeine Klonierungsverfahren

Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gel-elektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von  
45 Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von E. coli Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombi-

nanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

- 5 Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850 kann) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ
- 10 können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZerO (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984),
- 15 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

- 20 Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

#### 25 Beispiel 1

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

- 30 Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ur-
- 35 sprungkultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der
- 40 phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit
- 45 einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und

1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

## Beispiel 2

5

### Isolierung der DOXS aus E. coli

Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI  
10 und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-  
schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende um-  
faßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'  
(Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend  
mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende  
15 umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-  
GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers  
komplementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem  
Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI ent-  
haltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-  
20 Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben.  
Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli ein-  
gesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;

25 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;

25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)  
gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script  
30 (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der  
Sequenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment  
wurde BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen  
entsprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich  
das Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV  
35 35S Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die  
plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 3 und  
4 dargestellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-  
40 Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-  
Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der  
Transketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D  
(192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA  
des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-  
45 termination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus *E. coli* eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 5 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C
- 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C
- 25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

- Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den
- 10 Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CamV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft ( SEQ-ID No. 1 ). Dabei wurden zwei nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich
  - 15 zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

### Beispiel 3

20

Klonierung des Gens einer GGPPOR aus *Arabidopsis thaliana*

Isolierung von Gesamt-RNA aus voll entfaltetten Blättern von *Arabidopsis thaliana*:

25

Voll entfaltete Blätter von *A. thaliana* wurden geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Material wurde anschließend im Mörser pulverisiert und in Z6-Puffer (8 M Guanidium-hydrochlorid, 20 mM MES, 20 mM EDTA pH 7,0) aufgenommen. Die

- 30 Suspension wurde in Reaktionsgefäße überführt und mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 ausgeschüttelt. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 15000 U/min wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 1/20 Volumen 1N Essigsäure und 0,7 Volumen Ethanol (absolut) die RNA gefällt.

- 35 Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet zunächst mit 3M Natriumacetatlösung gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in 70% Ethanol. Anschließend wurde das Pellet in DEPC-Wasser gelöst und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Herstellung von cDNA aus gesamt RNA voll entfalteter Blätter von

40 *A. thaliana*:

20 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 3,3 µl 3M Natriumacetat-lösung und 2 µl 1M Magnesiumsulfatlösung versetzt und auf 100 µl Endvolumen mit DEPC Wasser aufgefüllt. Dazu wurde 1 µl RNase

- 45 freie DNase (Boehringer Mannheim) gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen des Enzyms durch Ausschütteln mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol wurde die RNA mit Ethanol

gefällt und das Pellet in 100 µl DEPC Wasser aufgenommen. 2,5 µg RNA aus dieser Lösung wurden mittels eines cDNA-Kits (Gibco, Life Technologies) in cDNA umgeschrieben.

- 5 Von der DNA-Sequenz der Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase (Keller et al, Eur. J. Biochem. (1998) 251(1-2), 413-417); Accession Number Y14044) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine SalI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid
- 10 am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGGCGACGACGGTTACTC-3' beginnend mit dem ersten Kodon der cDNA (kursiv gedruckt), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGTCGACGTGATGATAGATTACTAACAGAC-3' beginnend mit dem Basenpaar 1494 der cDNA Sequenz (kursiv gedruckt).
- 15 Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase von Stratagene GmbH, Heidelberg nach Herstellerangaben. Als Template wurde 1/8 Volumen der cDNA eingesetzt (entspricht 0,3 µg RNA). Das PCR-Programm lautete:
- 20 5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 48°C für 30 sec, 72°C für 2 min  
5 Zyklen: 94°C für 4 sec, 46°C für 30 sec, 72°C für 2 min  
25 Zyklen: 94°C für 4 sec, 44°C für 30 sec, 72°C für 2 min
- 25 Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit des Fragments wurde durch Sequenzierung überprüft ( SEQ ID No. 3 ). Mittels der durch die Primer an die Sequenz angefügten Restrikti-
- 30 onsschnittstellen wurde das Gen als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor BinAR-Hyg kloniert. Dieser enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846) zur Transkriptionster-
- 35 mination. Das Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren. Da das Plastidentransitpeptid der GGPPOR mitkloniert wurde, wird das Protein in transgenen Pflanzen in die Plastiden transportiert. Das Konstrukt ist in
- 40 Abbildung 5 dargestellt. Die Fragmente haben die folgende Bedeutung:
- Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-
- 45 Virus). Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur

Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrinsischen Plastidentransitsequenz.

#### Beispiel 4

5

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und GGPPOR Sequenzen

- Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und
- 10 die GGPPOR sind wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält ( Abbildung 6 ). Das GGPPOR-Gen mit der intrinsischen Plastidenlokalisationssequenz wurde (wie in Beispiel 3 beschrieben) als BamHI/SalI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR-Hyg kloniert. Das Gen der DOXS wurde
- 15 als BamHI-Fragment wie in Beispiel 2 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Dieses Plasmid vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen
- 20 das Antibiotikum Hygromycin und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

- Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,
- 25 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des
- 30 Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAACGGA-G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-
- 35 Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, Nucleic Acids Res.12(1984), 8711-8721) übertragen.

40

- Aus dem Plasmid pBinARHyg-GGPPOR wurde der 35S-Promotor, das GGPPOR-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den
- 45 Promotor und den Terminator wurde jeweils eine XbaI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGACATG-



GAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (Kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATTCTAGAGGACAA-TCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach 5 Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script von Stratagene GmbH, Heidelberg kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, welcher bereits wie oben beschrieben die Sequenz der DOXS 10 enthielt. Es entstand das Konstrukt pBinAR-DOXS-GGPPOR (Abbildung 6), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B enthält das Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment E enthält das Gen der DOXS. Fragment D 15 enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Fragment F enthält das Gen der GGPPOR inklusive der intrin- 20 sischen Plastidentransitsequenz.

#### Beispiel 5

#### Herstellung von transgenen Tabakpflanzen

25

(Nicotiana tabacum L. cv. Samsun NN)

Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit 30 Sequenzen der DOXS und der GGPPOR transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von Agrobacterium tumefaciens abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, Physiol. Plant (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im 40 Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtyllessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt. Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium 45 mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.



## Beispiel 6

Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

- 5 Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der GGPPOR verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-termination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H<sub>2</sub>O gewaschen, in 1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H<sub>2</sub>O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom *Agrobacterium*-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml *Agrobacterium*-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die *Agrobacterien*-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde

M 23.10.99

für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

20

## Beispiel 7

## Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

Die cDNA der DOXS und der GGPPOR wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolinges verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten transformierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 067056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698
- (H) TELEFAX: 0621-60-48821

(ii) ANMELDETITEL: DNA-Sequenzen codierend fuer eine DOXS und eine GGPPOR und deren Ueberproduktion in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1863 Basenpaare
- (B) ART: Nukleins"ure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase
- (B) STAMM: E.coli XL1 Blue

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1863

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSINFORMATION:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	AGT	TTT	GAT	ATT	GCC	AAA	TAC	CCG	ACC	CTG	GCA	CTG	GTC	GAC	TCC	48
Met	Ser	Phe	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Ser	
1				5				10						15		
ACC	CAG	GAG	TTA	CGA	CTG	TTG	CCG	AAA	GAG	AGT	TTA	CCG	AAA	CTC	TGC	96
Thr	Gln	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Cys	
			20					25						30		
GAC	GAA	CTG	CGC	CGC	TAT	TTA	CTC	GAC	AGC	GTG	AGC	CGT	TCC	AGC	GGG	144
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly	

25

40

45

CAC TTC GCC TCC GGG CTG GGC ACG GTC GAA CTG ACC GTG GCG CTG CAC	192
His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His	
50 55 60	
TAT GTC TAC AAC ACC CCG TTT GAC CAA TTG ATT TGG GAT GTG GGG CAT	240
Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His	
65 70 75 80	
CAG GCT TAT CCG CAT AAA ATT TTG ACC GGA CGC CGC GAC AAA ATC GGC	288
Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly	
85 90 95	
ACC ATC CGT CAG AAA GGC GGT CTG CAC CCG TTC CCG TGG CGC GGC GAA	336
Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu	
100 105 110	
AGC GAA TAT GAC GTA TTA AGC GTC GGG CAT TCA TCA ACC TCC ATC AGT	384
Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser	
115 120 125	
ACC GGA ATT GGT ATT GCG GTT GCT GCC GAA AAA GAA GGC AAA AAT CGC	432
Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg	
130 135 140	
CGC ACC GTC TGT GTC ATT GGC GAT GGC GCG ATT ACC GCA GGC ATG GCG	480
Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala	
145 150 155 160	
TTT GAA GCG ATG AAT CAC GCG GGC GAT ATC CGT CCT GAT ATG CTG GTG	528
Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val	
165 170 175	
ATT CTC AAC GAC AAT GAA ATG TCG ATT TCC GAA AAT GTC GGC GCG CTC	576
Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu	
180 185 190	
AAC AAC CAT CTG GCA CAG CTG CTT TCC GGT AAG CTT TAC TCT TCA CTG	624
Asn Asn His Leu Ala Gln Leu Leu Ser Gly Lys Leu Tyr Ser Ser Leu	
195 200 205	
CGC GAA GGC GGG AAA AAA GTT TTC TCT GGC GTG CCG CCA ATT AAA GAG	672
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu	
210 215 220	
CTG CTC AAA CGC ACC GAA GAA CAT ATT AAA GGC ATG GTA GTG CCT GGC	720
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly	
225 230 235 240	
ACG TTG TTT GAA GAG CTG GGC TTT AAC TAC ATC GGC CCG GTG GAC GGT	768
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly	
245 250 255	
CAC GAT GTG CTG GGG CTT ATC ACC ACG CTA AAG AAC ATG CGC GAC CTG	816
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu	
260 265 270	
AAA GGC CCG CAG TTC CTG CAT ATC ATG ACC AAA AAA GGT CGT GGT TAT	864
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr	
275 280 285	
GAA CCG GCA GAA AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC GCC GTG CCT AAA TTT	912

26

Glu	Pro	Ala	Glu	Lys	Asp	Pro	Ile	Thr	Phe	His	Ala	Val	Pro	Lys	Phe	
290						295					300					
GAT	CCC	TCC	AGC	GGT	TGT	TTG	CCG	AAA	AGT	AGC	GGC	GGT	TTG	CCG	AGC	960
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Cys	Leu	Pro	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser	
305					310					315					320	
TAT	TCA	AAA	ATC	TTT	GGC	GAC	TGG	TTG	TGC	GAA	ACG	GCA	GCG	AAA	GAC	1008
Tyr	Ser	Lys	Ile	Phe	Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Thr	Ala	Ala	Lys	Asp	
				325					330					335		
AAC	AAG	CTG	ATG	GCG	ATT	ACT	CCG	GCG	ATG	CGT	GAA	GGT	TCC	GGC	ATG	1056
Asn	Lys	Leu	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Met	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Met	
			340					345					350			
GTC	GAG	TTT	TCA	CGT	AAA	TTC	CCG	GAT	CGC	TAC	TTC	GAC	GTG	GCA	ATT	1104
Val	Glu	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Pro	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Ala	Ile	
		355					360					365				
GCC	GAG	CAA	CAC	GCG	GTG	ACC	TTT	GCT	GCG	GGT	CTG	GCG	ATT	GGT	GGG	1152
Ala	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Gly	
		370				375					380					
TAC	AAA	CCC	ATT	GTC	GCG	ATT	TAC	TCC	ACT	TTC	CTG	CAA	CGC	GCC	TAT	1200
Tyr	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr	Phe	Leu	Gln	Arg	Ala	Tyr	
385					390					395					400	
GAT	CAG	GTG	CTG	CAT	GAC	GTG	GCG	ATT	CAA	AAG	CTT	CCG	GTC	CTG	TTC	1248
Asp	Gln	Val	Leu	His	Asp	Val	Ala	Ile	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Phe	
				405					410				415			
GCC	ATC	GAC	CGC	GCG	GGC	ATT	GTT	GGT	GCT	GAC	GGT	CAA	ACC	CAT	CAG	1296
Ala	Ile	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Gln	Thr	His	Gln	
			420				425					430				
GGT	GCT	TTT	GAT	CTC	TCT	TAC	CTG	CGC	TGC	ATA	CCG	GAA	ATG	GTC	ATT	1344
Gly	Ala	Phe	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Met	Val	Ile	
		435					440				445					
ATG	ACC	CCG	AGC	GAT	GAA	AAC	GAA	TGT	CGC	CAG	ATG	CTC	TAT	ACC	GGC	1392
Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Glu	Asn	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Leu	Tyr	Thr	Gly	
		450				455					460					
TAT	CAC	TAT	AAC	GAT	GGC	CCG	TCA	GCG	GTG	CGC	TAC	CCG	CGT	GGC	AAC	1440
Tyr	His	Tyr	Asn	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn	
465					470					475					480	
GCG	GTC	GGC	GTG	GAA	CTG	ACG	CCG	CTG	GAA	AAA	CTA	CCA	ATT	GGC	AAA	1488
Ala	Val	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Gly	Lys	
				485					490				495			
GGC	ATT	GTG	AAG	CGT	CGT	GGC	GAG	AAA	CTG	GCG	ATC	CTT	AAC	TTT	GGT	1536
Gly	Ile	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Phe	Gly	
			500				505					510				
ACG	CTG	ATG	CCA	GAA	GCG	GCG	AAA	GTC	GCC	GAA	TCG	CTG	AAC	GCC	ACG	1584
Thr	Leu	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Thr	
			515				520					525				
CTG	GTC	GAT	ATG	CGT	TTT	GTG	AAA	CCG	CTT	GAT	GAA	GCG	TTA	ATT	CTG	1632
Leu	Val	Asp	Met	Arg	Phe	Val	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Ile	Leu	
		530				535					540					

27

GAA	ATG	GCC	GCC	AGC	CAT	GAA	GCG	CTG	GTC	ACC	GTA	GAA	GAA	AAC	GCC	1680
Glu	Met	Ala	Ala	Ser	His	Glu	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Glu	Asn	Ala	
545					550					555					560	
ATT	ATG	GGC	GGC	GCA	GGC	AGC	GGC	GTG	AAC	GAA	GTG	CTG	ATG	GCC	CAT	1728
Ile	Met	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Met	Ala	His	
				565					570					575		
CGT	AAA	CCA	GTA	CCC	GTG	CTG	AAC	ATT	GGC	CTG	CCG	GAC	TTC	TTT	ATT	1776
Arg	Lys	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Asn	Ile	Gly	Leu	Pro	Asp	Phe	Phe	Ile	
			580					585					590			
CCG	CAA	GGA	ACT	CAG	GAA	GAA	ATG	CGC	GCC	GAA	CTC	GGC	CTC	GAT	GCC	1824
Pro	Gln	Gly	Thr	Gln	Glu	Glu	Met	Arg	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala	
		595					600					605				
GCT	GGT	ATG	GAA	GCC	AAA	ATC	AAG	GCC	TGG	CTG	GCA	TA				1863
Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Lys	Ile	Lys	Ala	Trp	Leu	Ala					
610						615					620					

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 620 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met	Ser	Phe	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Ser
1				5					10					15	
Thr	Gln	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Cys
			20					25					30		
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly
		35					40					45			
His	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	His
	50					55					60				
Tyr	Val	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Trp	Asp	Val	Gly	His
65					70					75					80
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly
				85					90					95	
Thr	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Gly	Glu
			100					105					110		
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser
		115					120					125			
Ala	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg
		130				135					140				
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala
145					150					155					160
Phe	Glu	Ala	Met	Asn	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Val
				165					170					175	
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu
			180					185					190		
Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu

28

195	200	205
Arg Glu Gly Gly Lys Lys Val Phe Ser Gly Val Pro Pro Ile Lys Glu		
210	215	220
Leu Leu Lys Arg Thr Glu Glu His Ile Lys Gly Met Val Val Pro Gly		
225	230	235
Thr Leu Phe Glu Glu Leu Gly Phe Asn Tyr Ile Gly Pro Val Asp Gly		
	245	250
		255
His Asp Val Leu Gly Leu Ile Thr Thr Leu Lys Asn Met Arg Asp Leu		
	260	265
		270
Lys Gly Pro Gln Phe Leu His Ile Met Thr Lys Lys Gly Arg Gly Tyr		
	275	280
		285
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe		
	290	295
		300
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser		
305	310	315
		320
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp		
	325	330
		335
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met		
	340	345
		350
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile		
	355	360
		365
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly		
	370	375
		380
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr		
385	390	395
		400
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe		
	405	410
		415
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln		
	420	425
		430
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile		
	435	440
		445
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly		
	450	455
		460
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn		
465	470	475
		480
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys		
	485	490
		495
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly		
	500	505
		510
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr		
	515	520
		525
Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu		
	530	535
		540
Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala		
545	550	555
		560
Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His		
	565	570
		575



29

Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile  
 580 585 590  
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala  
 595 600 605  
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala  
 610 615 620

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1479 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1401

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSIONFORMATION:

- (A) AUTORS: 3-SEP-2000,
- (G) DATUM: 2000

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATG GCG ACG ACG GTT ACA CTC AAA TCC TTC ACC GGA CTT CGT CAA TCA	48
Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser	
1 5 10 15	
TCA ACG GAG CAA ACA AAC TTC GTC TCT CAT GTA CCG TCA TCA CTT TCT	96
Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser	
20 25 30	
CTC CCT CAA CGA CGG ACC TCT CTC CGA GTA ACC GCA GCC AGG GCC ACT	144
Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr	
35 40 45	
CCC AAA CTC TCC AAC CGT AAA CTC CGT GTC GCC GTC ATC GGT GGT GGA	192
Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly	
50 55 60	
CCA GCA GGC GGG GCA GCT GCA GAG ACT CTA GCA CAA GGA GGA ATC GAG	240
Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu	
65 70 75 80	
ACG ATT CTC ATC GAG CGT AAG ATG GAC AAT TGC AAG CCT TGC GGT GGC	288
Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly	
85 90 95	
GCG ATT CCT CTC TGT ATG GTC GGA GAA TTC AAC TTG CCG TTG GAT ATT	336
Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile	
100 105 110	
ATT GAT CGG AGA GTG ACG AAG ATG AAG ATG ATT TCG CCG TCG AAC ATT	384
Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile	
115 120 125	
GCT GTT GAT ATT GGT CGT ACG CTT AAG GAG CAT GAG TAT ATA GGT ATG	432

30

Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met	
130 135 140	
GTG AGA AGA GAA GTT CTT GAT GCT TAT CTG AGA GAG AGA GCT GAG AAG	480
Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys	
145 150 155 160	
AGT GGA GCC ACT GTG ATT AAC GGT CTC TTC CTT AAG ATG GAT CAT CCG	528
Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro	
165 170 175	
GAG AAT TGG GAC TCG CCG TAC ACT TTG CAT TAC ACT GAG TAC GAT GGT	576
Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly	
180 185 190	
AAA ACT GGA GCT ACA GGG ACG AAG AAA ACA ATG GAG GTT GAT GCT GTC	624
Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val	
195 200 205	
ATT GGA GCT GAT GGA GCT AAC TCT AGG GTT GCT AAA TCT ATT GAT GCT	672
Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala	
210 215 220	
GGT GAT TAC GAC TAC GCA ATT GCA TTT CAG GAG AGG ATT AGG ATT CCT	720
Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro	
225 230 235 240	
GAT GAG AAA ATG ACT TAC TAT GAG GAT TTA GCT GAG ATG TAT GTT GGA	768
Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly	
245 250 255	
GAT GAT GTG TCG CCG GAT TTC TAT GGT TGG GTG TTC CCT AAG TGC GAC	816
Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp	
260 265 270	
CAT GTA GCT GTT GGA ACA GGT ACT GTG ACT CAC AAA GGT GAC ATC AAG	864
His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys	
275 280 285	
AAG TTC CAG CTC GCG ACC AGA AAC AGA GCT AAG GAC AAG ATT CTT GGA	912
Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly	
290 295 300	
GGG AAG ATC ATC CGT GTG GAG GCT CAT CCG ATT CCT GAA CAT CCG AGA	960
Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg	
305 310 315 320	
CCA CGT AGG CTC TCG AAA CGT GTG GCT CTT GTA GGT GAT GCT GCA GGG	1008
Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly	
325 330 335	
TAT GTG ACT AAA TGC TCT GGT GAA GGG ATC TAC TTT GCT GCT AAG AGT	1056
Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser	
340 345 350	
GGA AGA ATG TGT GCT GAA GCC ATT GTC GAA GGT TCA CAG AAT GGT AAG	1104
Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys	
355 360 365	
AAG ATG ATT GAC GAA GGG GAC TTG AGG AAG TAC TTG GAG AAA TGG GAT	1152
Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp	
370 375 380	

31

AAG ACA TAC TTG CCT ACC TAC AGG GTA CTT GAT GTG TTG CAG AAA GTG 1200  
 Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val  
 385 390 395 400  
 TTT TAC AGA TCA AAT CCG GCT AGA GAA GCG TTT GTG GAG ATG TGT AAT 1248  
 Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn  
 405 410 415  
 GAT GAG TAT GTT CAG AAG ATG ACA TTC GAT AGC TAT CTG TAC AAG CGG 1296  
 Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg  
 420 425 430  
 GTT GCG CCG GGT AGT CCT TTG GAG GAT ATC AAG TTG GCT GTG AAC ACC 1344  
 Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr  
 435 440 445  
 ATT GGA AGT TTG GTT AGG GCT AAT GCT CTA AGG AGA GAG ATT GAG AAG 1392  
 Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys  
 450 455 460  
 CTT AGT GTT TAAGAAACAA ATAATGAGGT CTATCTCCTT TCTTCATCTC 1441  
 leu Ser Val  
 465  
 TATCTCTCTT TTTTGTCTG TTAGTAATCT ATCTACAC 1479

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 467 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Ala Thr Thr Val Thr Leu Lys Ser Phe Thr Gly Leu Arg Gln Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Thr Glu Gln Thr Asn Phe Val Ser His Val Pro Ser Ser Leu Ser  
 20 25 30  
 Leu Pro Gln Arg Arg Thr Ser Leu Arg Val Thr Ala Ala Arg Ala Thr  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Ser Asn Arg Lys Leu Arg Val Ala Val Ile Gly Gly Gly  
 50 55 60  
 Pro Ala Gly Gly Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ala Gln Gly Gly Ile Glu  
 65 70 75 80  
 Thr Ile Leu Ile Glu Arg Lys Met Asp Asn Cys Lys Pro Cys Gly Gly  
 85 90 95  
 Ala Ile Pro Leu Cys Met Val Gly Glu Phe Asn Leu Pro Leu Asp Ile  
 100 105 110  
 Ile Asp Arg Arg Val Thr Lys Met Lys Met Ile Ser Pro Ser Asn Ile  
 115 120 125  
 Ala Val Asp Ile Gly Arg Thr Leu Lys Glu His Glu Tyr Ile Gly Met  
 130 135 140  
 Val Arg Arg Glu Val Leu Asp Ala Tyr Leu Arg Glu Arg Ala Glu Lys  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Thr Val Ile Asn Gly Leu Phe Leu Lys Met Asp His Pro

32

165

170

175

Glu Asn Trp Asp Ser Pro Tyr Thr Leu His Tyr Thr Glu Tyr Asp Gly  
180 185 190

Lys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Lys Lys Thr Met Glu Val Asp Ala Val  
195 200 205

Ile Gly Ala Asp Gly Ala Asn Ser Arg Val Ala Lys Ser Ile Asp Ala  
210 215 220

Gly Asp Tyr Asp Tyr Ala Ile Ala Phe Gln Glu Arg Ile Arg Ile Pro  
225 230 235 240

Asp Glu Lys Met Thr Tyr Tyr Glu Asp Leu Ala Glu Met Tyr Val Gly  
245 250 255

Asp Asp Val Ser Pro Asp Phe Tyr Gly Trp Val Phe Pro Lys Cys Asp  
260 265 270

His Val Ala Val Gly Thr Gly Thr Val Thr His Lys Gly Asp Ile Lys  
275 280 285

Lys Phe Gln Leu Ala Thr Arg Asn Arg Ala Lys Asp Lys Ile Leu Gly  
290 295 300

Gly Lys Ile Ile Arg Val Glu Ala His Pro Ile Pro Glu His Pro Arg  
305 310 315 320

Pro Arg Arg Leu Ser Lys Arg Val Ala Leu Val Gly Asp Ala Ala Gly  
325 330 335

Tyr Val Thr Lys Cys Ser Gly Glu Gly Ile Tyr Phe Ala Ala Lys Ser  
340 345 350

Gly Arg Met Cys Ala Glu Ala Ile Val Glu Gly Ser Gln Asn Gly Lys  
355 360 365

Lys Met Ile Asp Glu Gly Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Glu Lys Trp Asp  
370 375 380

Lys Thr Tyr Leu Pro Thr Tyr Arg Val Leu Asp Val Leu Gln Lys Val  
385 390 395 400

Phe Tyr Arg Ser Asn Pro Ala Arg Glu Ala Phe Val Glu Met Cys Asn  
405 410 415

Asp Glu Tyr Val Gln Lys Met Thr Phe Asp Ser Tyr Leu Tyr Lys Arg  
420 425 430

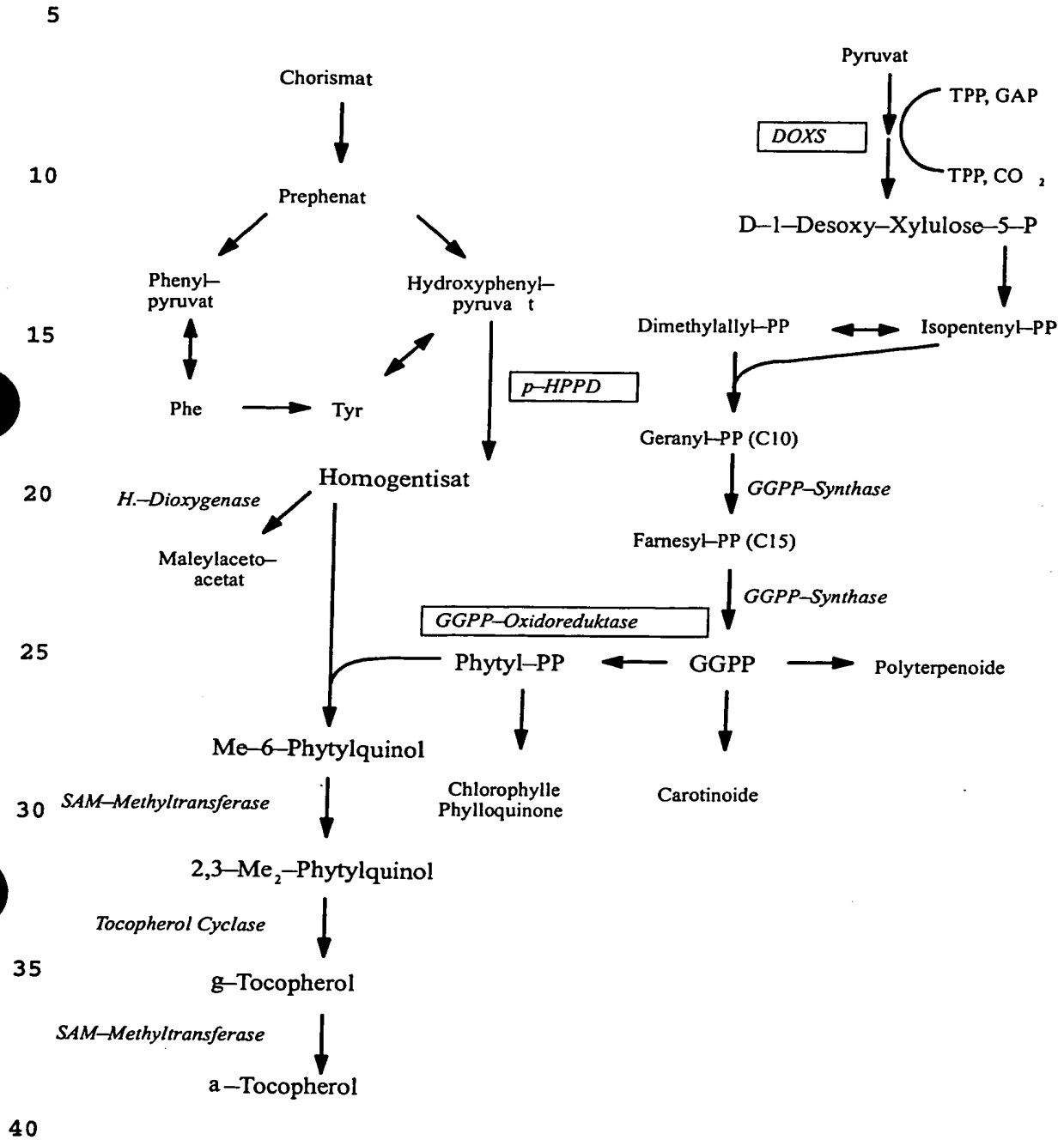
Val Ala Pro Gly Ser Pro Leu Glu Asp Ile Lys Leu Ala Val Asn Thr  
435 440 445

Ile Gly Ser Leu Val Arg Ala Asn Ala Leu Arg Arg Glu Ile Glu Lys  
450 455 460

Leu Ser Val  
465

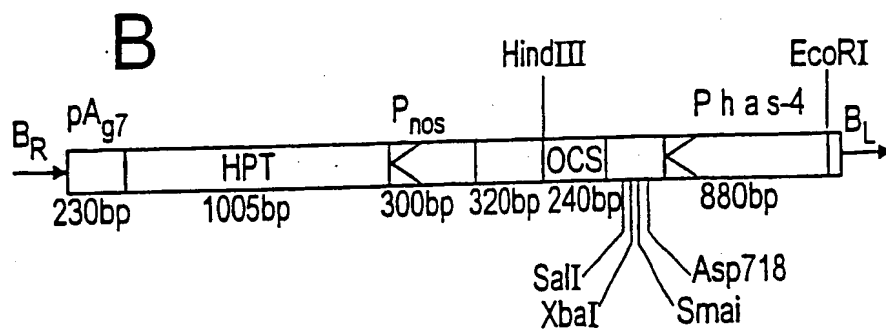
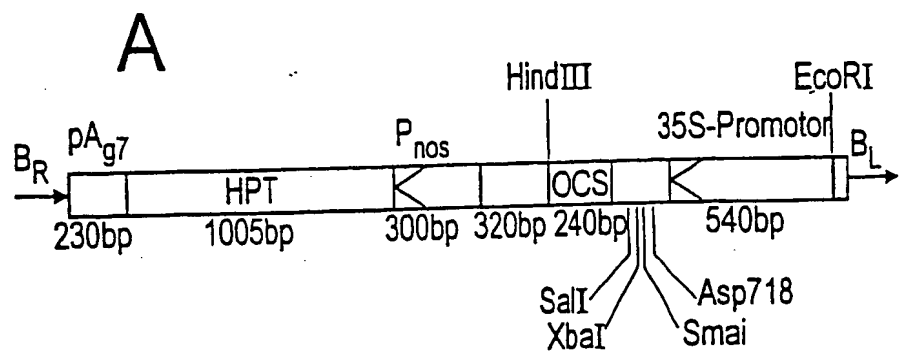
Abbildung 1

## Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels



M 23.10.99

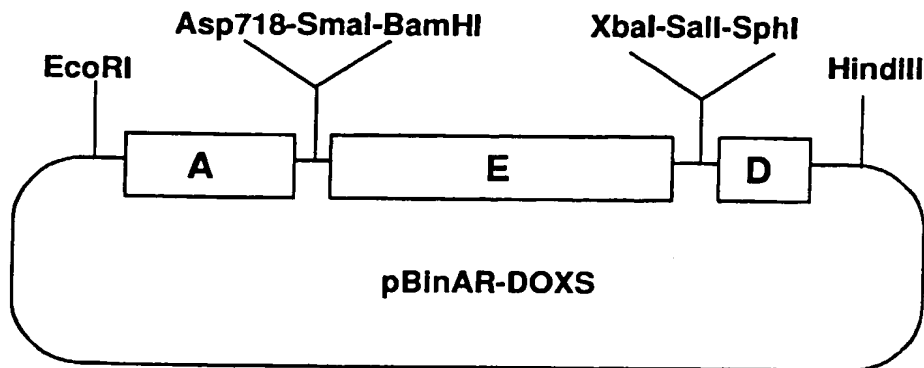
Abbildung 2



M 23.10.99

Abbildung 3

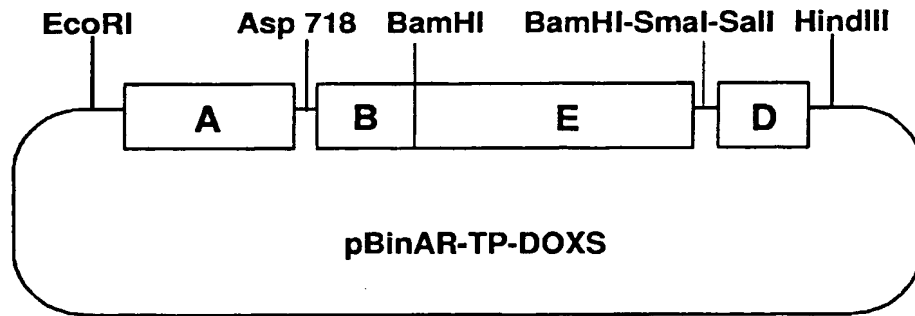
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im  
Zytosol transgener Pflanzen



M 23.10.99

Abbildung 4

Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli im  
Plastiden transgener Pflanzen

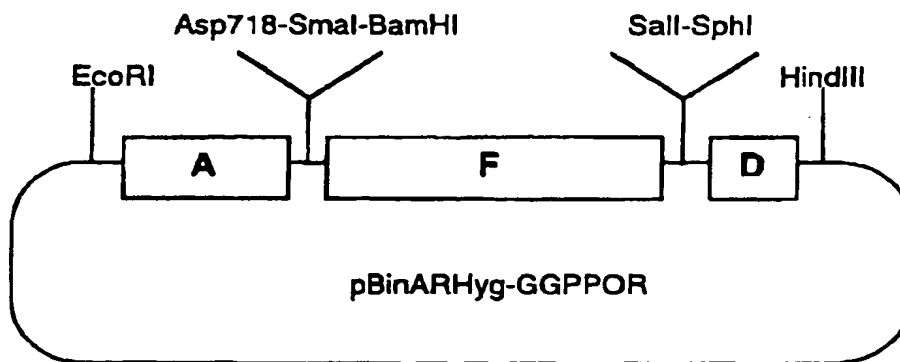




M 2310 99

Abbildung 5

Binärer Vektor zur Überexpression des GGPPOR-Gens aus *Arabidopsis thaliana* in Plastiden transgener Pflanzen.





M 23 10 99

DNA-Sequenzen codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gen und eine Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase und deren Überproduktion in Pflanzen

5

#### Zusammenfassung

---

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus E.coli und einer Geranylgeranyl-Pyrophosphat Oxidoreduktase aus Arabidopsis thaliana.

15

20

25

30

35

40

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**